この添付文書をよく読んでから使用して下さい

体外診断用医薬品

240500/R2
※2011年2月改訂（第2版）
2008年4月作成

Ⅰ型コラーゲン架橋N-テロペプチドキット

オステオマーク
OSTEOMARK®

ELISA法　尿中Ⅰ型コラーゲン架橋N-テロペプチド（NTx）測定試薬

日本標準商品分類番号　877449
承認番号　20900AMZ00592000

【全般的な注意】

1. 本製品は体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないこと。
2. 診断は、他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断すること。
3. 添付文書記載以外の使用方法については、保証できない。
4. 本キットの抗原結合プレート、標準溶液及びコントロール尿に含まれるヒト由来成分はHBs抗原、HIV抗体及びHCV抗体陰性のものを使用しているが、万一の場合を考慮して感染性のあるものとして慎重に取り扱うこと。
5. 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用すること。

【形状・構造等（キットの構成）】

本試薬は次の試薬及び付属品からなる。

試　薬

(A) 抗原結合プレート（8ウェル×12ストリップ）……1枚
　1ウェル中、感度が20nmol BCE/Lとなる量のNTxを含有
(B) 酵素標識抗体（原液）（0.4mL）……1本
　1ウェル測定分中、感度が20nmol BCE/Lとなる量のペルオキシダーゼ標識抗NTxモノクローナル抗体（マウス）を含有
(C) 酵素標識抗体希釈液（30mL）……1本
　1mL中、ウシ血清アルブミンを2.5mg含有
(D) 洗浄液（原液）（125mL）……1本
　1mL中、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタンを16.48mg含有
(E) 発色剤（0.9mL）……1本
　1mL中、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを10mg含有
(F) 基質（30mL）……1本
　1mL中、過酸化水素を0.093mg含有
(G) 停止剤（25mL）……1本
　1mL中、硫酸を50.4mg含有

標準溶液（各0.4mL）……1セット
- (1) 標準溶液 A（1nmol BCE/L）　1本
- (2) 標準溶液 B（30nmol BCE/L）　1本
- (3) 標準溶液 C（100nmol BCE/L）　1本
- (4) 標準溶液 D（300nmol BCE/L）　1本
- (5) 標準溶液 E（1,000nmol BCE/L）　1本
- (6) 標準溶液 F（3,000nmol BCE/L）　1本

コントロール尿（各0.4mL）……1セット
- （Ⅰ）コントロール尿 低濃度用　1本
- （Ⅱ）コントロール尿 高濃度用　1本

付属品

プレートシール……6枚

【使用目的】

尿中Ⅰ型コラーゲン架橋N-テロペプチド（NTx）の測定

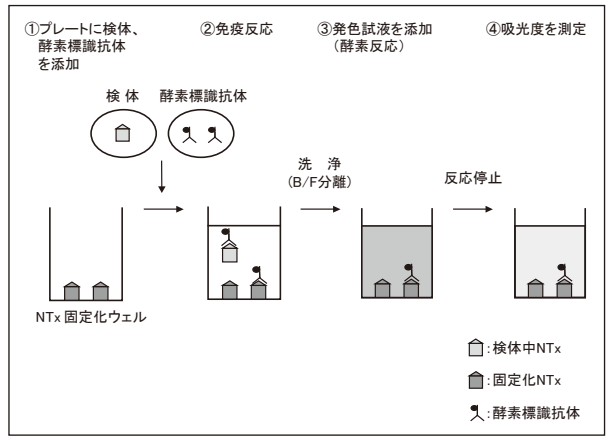
【測定原理】

1. 測定原理

本試薬はコラーゲンの代謝産物としてヒト尿中に排泄されるⅠ型コラーゲン架橋N-テロペプチド（NTx）をELISA法（Enzyme-linked immunosorbent assay）により測定する試薬である[1~4]。免疫反応の形式として競合反応を利用し、抗原の固定化の担体としてマイクロタイタープレートを用いている。標準溶液、検体又はコントロール尿をそれぞれ各ウェルに添加し、さらに酵素標識抗体を加えることにより免疫反応が開始される。検体中のNTxの増加とともに固相に結合する酵素標識抗体の量が減少するので、未反応の酵素標識抗体を洗浄により除去（B/F分離）すると、検体中のNTxの量に反比例した量の酵素標識抗体が固相上に残る。発色試液を添加することにより酵素反応が開始され、固相上に結合した酵素標識抗体の量に応じて青色の呈色反応が起こる。停止剤で酵素反応を停止すると発色は黄色に変化し、この呈色を測定することにより検体中のNTx濃度を知ることができる[4]。

測定結果は骨コラーゲンをハイドロキシプロリンで定量した結果をもとに算出した値で示され、骨コラーゲン相当量（Bone Collagen Equivalents：BCE）の単位で表示される。すなわち、1モルのⅠ型コラーゲンの分解産物のうち、本試薬に使用しているモノクローナル抗体と結合するNTxの量が1モルBCEとして示される。なお、測定には尿中クレアチニン値による補正が必要であり、測定結果はnmol BCE/mmol Crとして表される。

【原理図】



2. 特徴

(1) 骨に特異的なⅠ型コラーゲン架橋N-テロペプチド（NTx）に特異性の高いモノクローナル抗体を使用しており、遊離のピリジノリン及びデオキシピリジノリンとは反応しない。
(2) 検体の前処理操作は不要である。
(3) NTxは安定な物質であり、保存による影響を受けにくい。

【操作上の注意】

1．検体の採取方法

測定には随意尿を用いるが、NTx の排泄は夜間に高く午後に低値を示すことが報告されている[5]ので、早朝第 2 尿を用いることが推奨される。また、NTx の測定を治療効果のモニター等に使用する場合には、治療開始前に測定を実施し、治療前値を把握すること。治療開始後の検体は、できるだけ同時刻に採取することが望ましい。

2．妨害物質

(1) 検体中の共存物質として、アルブミンは 500mg/dL まで、グロブリンは 500mg/dL まで、ヘモグロビンは 5mg/dL まで、ビリルビンは 20mg/dL まで、グルコースについては 2,000mg/dL まで測定に及ぼす影響は認められなかったが、血液の混入が認められる尿は測定値に影響するため用いないこと。

(2) 骨代謝改善薬として使用されているアルファカルシドールは 30ng/mL まで、イプリフラボンは 4mg/mL まで、乳酸カルシウムは 3mg/mL までを尿に添加した時、測定に及ぼす影響は認められなかった。

(3) アセトアミノフェン、アセチルサリチル酸、カフェインは 5mg/mL まで、アスコルビン酸、アトロピンは 0.5mg/mL までを尿に添加した時、測定に及ぼす影響は認められなかった。

【用法・用量(操作方法)】

本試薬の操作方法は次のとおりである。なお、測定は原則として二重測定(duplicate)で行うこと。

1．測定に必要な機器及び器具

ピペット(25、100、200μL 及び1mL 以上)及びチップ
プレートウォッシャー
プレートリーダー(測定波長 450nm：対照波長として 630nm が推奨される。なお、OD が 3.0 まで測定可能なものが望ましい。)

2．測定の準備

(1) すべての試薬を 18 ～ 28℃に戻す。特に発色剤は、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解されているので、低温では固化しているため酵素反応の前に必ず 18 ～ 28℃に戻し融解しておくこと。

(2) 洗浄液の調製

洗浄液(原液)を精製水で 30 倍に希釈し、洗浄液を調製する。調製した洗浄液は、常温で1カ月保存可能である。

(3) 酵素標識抗体溶液の調製

酵素標識抗体(原液)を酵素標識抗体希釈液で 101 倍に希釈し、酵素標識抗体溶液を調製する。希釈時の撹拌はできるだけ泡立てないように転倒撹拌で行い、ボルテックスミキサーやマグネチックスターラーを用いないこと。

酵素標識抗体溶液は調製後1時間以内に使用すること。

3．操作

(1) 抗原結合プレートをアルミ袋から取り出し、必要な数のストリップを準備する。
(使用しないストリップは、必ず乾燥剤の入った元のアルミ袋に入れシールをし、2 ～ 10℃に保存すること。)

(2) 抗原結合プレートの各ウェルに標準溶液、検体又はコントロール尿の各 25μL を加える。

(3) 酵素標識抗体溶液 200μL を各ウェルに加え、プレートシールをした後に 5 ～10 秒間ゆるやかに撹拌を行う。この際に各ウェルの溶液が、ウェルの壁やプレートシールにはね上がらないように注意すること。

(4) 18 ～ 28℃で 90分間(±5分)静置する(免疫反応)。

(5) 発色剤を基質で101倍に希釈し、発色試液を調製する(この操作は免疫反応が終了する約10分前に行う)。希釈時の撹拌は転倒撹拌で行い、ボルテックスミキサーやマグネチックスターラーは用いないこと。

(6) 免疫反応終了後、注意深くプレートシールをはがし、各ウェルの溶液を吸引除去する。その後、洗浄液で5回洗浄を行う(1回の洗浄液量は1ウェル当たり350μL以上で行う)。洗浄後、抗原結合プレートを逆さまにし、ペーパータオル等に軽くたたきつけて、洗浄液を完全に除去する。

(7) 各ウェルに直ちに発色試液200μLを加え、新しいプレートシールをし、18～28℃で15分間(±1分)静置する(酵素反応)。

(8) 注意深くプレートシールをはがし、停止剤100μLを各ウェルに加え、酵素反応を停止する。

(9) 5～10秒間ゆるやかに撹拌した後、18～28℃に5分間静置する。

(10)酵素反応停止後30分以内に波長450nmにおける吸光度を測定する。

4．NTx濃度(nmol BCE/L)の算出

横軸にNTx濃度を、縦軸に吸光度をとり、標準溶液を測定して得られた吸光度をプロットして標準曲線を作成する(標準曲線の回帰には4係数ロジスティック曲線を用いることが望ましい)。コントロール尿及び検体を測定して得られた吸光度からNTx濃度を読みとり、検体中のNTx濃度を求める。なお、尿中のNTx濃度が3,000nmol BCE/Lを超える濃度の検体では、濃度既知の尿で希釈して測定を行い、そのNTx濃度を希釈検体濃度の算出に用いる。たとえば、300nmol BCE/Lの尿で5倍希釈(1：4)し、測定値として1,040nmol BCE/Lを得たとき、実際のNTx濃度は

(1,040×5)－(300×4)＝4,000nmol BCE/L となる。

5．尿中クレアチニン値による補正

測定値は尿中クレアチニン値による補正が必要であり、測定結果はnmol BCE/mmol Crとして表される。

クレアチニン値がmg/dLで表示されている場合、以下の計算式を使用する。

mmol/L クレアチニン値 ＝ (mg/dL クレアチニン値)/11.3*

＊：mg Cr/dL から mmol Cr/L への変換係数

たとえば、NTx測定値が360nmol BCE/Lでクレアチニン値が60mg/dLの場合のNTx値は

360 ÷ (60/11.3)＝68nmol BCE/mmol Cr となる。

6．コントロール尿中のNTx濃度

コントロール尿 低濃度用及び高濃度用のNTx濃度は、キットに添付されているコントロール尿測定参考値カードに記載されている。参考値は、尿中NTxの測定が正しく行われているかどうかの参考として用いる。

【測定結果の判定法】

NTxの基準値として以下の数値が推奨されている[6]。

9.3～54.3nmol BCE/mmol Cr
(30～44歳、女性：平均±1.96SD)

【臨床的意義】

本試薬はNTxに特異性の高いモノクローナル抗体を使用しており、Ⅰ型以外のコラーゲン代謝物は認識しない。また、骨以外の組織由来コラーゲン代謝の影響は少なく、骨吸収に対する特異性が優れている。国内での臨床試験の結果から、下記の臨床上の有用性が確かめられている。

① 骨粗しょう症の薬剤治療方針の選択の指標及び薬剤効果判定の指標
② 原発性副甲状腺機能亢進症の手術適応の決定
③ 副甲状腺機能亢進症手術後の治療効果判定
④ 悪性腫瘍の骨転移の指標及び骨転移病巣の進行度の指標

【性能】

操作方法に従い測定を行ったとき、感度、特異性、再現性及び測定範囲は以下のとおりである。

1. 感度

統計学的検定に基づく本試験の測定感度は20nmol BCE/Lである(t検定：n＝8)。

2. 特異性

既知濃度の管理検体を測定するとき、測定値はその濃度の85～115%にある。

3. 再現性

同一検体を8回同時に測定するとき、測定値の変動係数は10%以下である。

4. 測定範囲

尿中のNTx濃度が20nmol BCE/Lから3,000nmol BCE/Lまでの検体を測定できる。3,000nmol BCE/L以上の濃度の検体では、濃度既知の尿で希釈して測定を行う。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 一般的注意

(1) 本試薬は2～10℃で保存すること。
(2) 発色剤にはDMSOを、また停止剤には硫酸を用いているので、手などに付着しないよう十分に注意して取り扱うこと。誤って付いた場合には直ちに大量の水で洗い流すこと。
(3) 保存や反応の間に試薬に強い光を当てないこと。
(4) 使用期限の過ぎたキットを使用しないこと。
(5) 残ったストリップは、必ず乾燥剤の入った元のアルミ袋に入れシールをし、2～10℃に保存すること。
(6) 本品は同一製造番号の試薬間で正確な測定ができるように調製されているので、他の製造番号の試薬と組み合わせて使用しないこと。

2. 検体

(1) 検体には尿を用い、血清を用いないこと。
(2) 検体には防腐剤を添加しないこと。
(3) 血液の混入が認められる尿は、測定に用いないこと。また、沈殿物の認められる尿は使用前に遠心分離等で異物を除去すること。
(4) 検体を保存する場合には低温で保存し、72時間以内に測定を実施すること。なお、検体を長時間保存する場合には、凍結(－20℃以下)すること。

3. 反応操作

(1) 正しい結果を得るために、清浄な器具を使用すること。
(2) 各操作における反応時間を厳守すること。
(3) 唾液の混入は測定値に影響を及ぼすので、測定の際に唾液が混入しないように注意すること。
(4) 標準溶液、検体及びコントロール尿を抗原結合プレートの各ウェルに分注する際にはウェルの底に添加し、ウェルの壁に触れないように注意すること。また、検体間の相互汚染を避けるため、各検体毎に新しいチップを使用すること。
(5) 調製された発色試液は無色澄明な溶液である。使用前に青色に着色している場合には、汚染されているので使用しないこと。
(6) プレートシールは常に新しいものを用い、再使用しないこと。
(7) 測定結果が3,000nmol BCE/Lより高値になった場合には、検体を濃度既知の尿で希釈して測定を行うこと。

4. 非特異反応

血清を検体として用いる試薬の場合、リウマチ因子の存在する検体や自己免疫疾患患者血清では非特異的な反応が起こることが知られている。本試薬は尿を検体として用いるので、このような現象は起こらないと考えられるが、患者の服用している薬剤や尿の保存状態等が原因となり異常と思われる値が発生する可能性もある。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法

冷所(2～10℃)に保存する。

2. 有効期間

12ヶ月(使用期限は外箱に表示)

【包装単位】

1プレート(96テスト)

【主要文献】

1) Hanson D. A., Eyre D. R. et al. : J. Bone Miner. Res. 7 (11), 1251～1258 (1992)
2) Gertz B. J., Eyre D. R. et al. : J. Bone Miner. Res. 9 (2), 135～142 (1994)
3) Chesnut C. H. et al. : Am. J. Med. 102, 29～37 (1997)
4) Clemens J. D. et al. : 14th Annual Meeting of the American Society for Bone Mineral Research.
5) Blumsohn A., Eyre D. R. et al. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 79 (3), 730～735 (1994)
6) 骨粗鬆症診療における骨代謝マーカーの適正使用ガイドライン(2004年度版); Osteoporosis Japan 12 (2), 191～204 (2004)

※【問い合わせ先】

アリーア メディカル株式会社 お客様相談室
〒160-0023 東京都新宿区西新宿1-24-1
フリーダイヤル 0120-1874-86
受付時間 9:00～17:00 (土、日、祝日を除く)

※【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

アリーア メディカル株式会社
〒270-2214 千葉県松戸市松飛台357
TEL 047-311-5750

Alere™
製造販売元
アリーア メディカル 株式会社
千葉県松戸市松飛台357

©2011 Alere. All rights reserved.